



TITLE:

Metabolic analysis and development of efficient gene-targeting systems in oleaginous fungi for useful lipid production(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kikukawa, Hiroshi

CITATION:

Kikukawa, Hiroshi. Metabolic analysis and development of efficient gene-targeting systems in oleaginous fungi for useful lipid production. 京都大学, 2015, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19047>

RIGHT:

許諾条件により本文は2016/03/23に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	菊川寛史
論文題目	Metabolic analysis and development of efficient gene-targeting systems in oleaginous fungi for useful lipid production （有用油脂生産のための油糧糸状菌の代謝解析と効率的遺伝子ターゲティングシステムの構築）		
（論文内容の要旨）			
<p>不飽和脂肪酸は多彩な生理活性を有するため、近年医薬品や健康食品として利用されており、需要が増加している。不飽和脂肪酸の主な供給源は魚油や植物油などの天然資源に限られ、また供給源の確立されていない不飽和脂肪酸種も多い。このため、油糧微生物を活用した不飽和脂肪酸の効率的生産が注目されている。本研究では有用不飽和脂肪酸として、エイコセン酸（EA）、ω3系高度不飽和脂肪酸（ω3系PUFA）、ジホモ-γ-リノレン酸（DGLA）を取り上げ、これらの生産に関して、生産微生物の探索、生合成酵素の機能解析、ならびに高効率な標的遺伝子破壊のための遺伝子ターゲティング（GT）システムの構築とPUFAの選択的高生産株の分子育種を試みた。</p> <p>第一章では、エイコセン酸（20:1ω9, EA）の効率的な微生物生産を試みた。EAは植物油に存在し、保湿効果があることから化粧品やクリーム剤として利用される有用不飽和脂肪酸である。一方、EAを高蓄積する微生物は知られていなかったことから、EA生産微生物の探索を試みた。研究室保存菌株とそれらの近縁種、約300株から脂質を抽出、メチルエステル誘導体化した後、ガスクロマトグラフィー分析によりEA生産性を評価した。結果、<i>Mortierella chlamydospora</i> CBS 529.75を高生産株として見いだした。本菌を至適条件（28°Cで4日間培養後12°Cで3日間）にて培養することにより、総脂肪酸に占めるEAの割合が15%、最大生産量460 mg/L broth（蓄積量36.3 mg/g of dried cell）のEA生産を実現した。</p> <p>第二章では、酵母発現系を用いて<i>Mortierella alpina</i> 1S-4のもつω3不飽和化酵素（Maw3）の機能解析を行った。抗高脂血症薬などに利用されているエイコサペンタエン酸（20:5ω3, EPA）に代表されるω3系PUFAは、近年医薬品や機能性食品などへの利用が増加している脂肪酸群である。ω3系PUFAの生合成を担うMaw3の酵素機能を解析した。まず、<i>M. alpina</i> 1S-4から<i>maw3</i>遺伝子を単離し、本遺伝子発現酵母を用いて種々の脂肪酸基質に対する変換反応を指標に酵素機能を評価した。結果、本酵素はω3不飽和化酵素としてC18、C20のω6系PUFAを対応するω3系PUFAに変換するだけでなく、Δ12/Δ15不飽和化酵素としても機能し、C16脂肪酸のΔ12位とΔ15位に二重結合を導入することで16:1ω7を16:3ω1に変換することを明らかにした。</p> <p>第三章から第五章では、<i>M. alpina</i> 1S-4における効率的なGTシステムの構築とこれを応用したPUFAの選択的生産を試みた。これまでに、化学変異剤処理による突然変異誘導によって<i>M. alpina</i> 1S-4由来の様々なPUFA高生産株が取得されている。しかし、ランダムな突然変異誘導では、意図する変異株の取得が困難なうえ、標的遺伝</p>			

子以外にも変異が導入され生育速度や脂肪酸生産性にも影響を及ぼす。PUFAの高生産株を取得するためには、標的遺伝子の破壊による分子育種が望ましい。一般的に、損傷DNAの修復及びDNAの組換え時には、相同配列をもとに修復を行う相同組換えとランダムな位置での非相同末端結合（NHEJ）による組換えの二機構が関与する。*M. alpina* 1S-4を含めた糸状菌において二本鎖DNA切断が修復される際、NHEJが優先されるため、相同組換えを利用したGTの効率が低い。PUFAの選択的生産にむけた分子育種のため、本菌のNHEJに関与する遺伝子を欠損させることによるGTの効率改善を検討した。

第三章では、NHEJに関与するKu80タンパク質を標的としてGTシステムの構築を試みた。まず本菌のNHEJに関与する*ku80*遺伝子の塩基配列を決定した。この配列を標的として*ku80*遺伝子破壊ベクターを遺伝子銃法により本菌の胞子に導入し、1.3%の効率で一回交差相同組換えによる*ku80*破壊株を作製した。続いて、*ku80*破壊株を宿主として、DGLAをアラキドン酸に変換する $\Delta 5$ 不飽和化酵素（ $\Delta 5ds$ ）をコードする遺伝子の破壊を試みた。結果、3%のGT効率で $\Delta 5ds$ 破壊株を取得した。本 $\Delta 5ds$ 破壊株においては、DGLA含有率が3%から37%に増加した。

第四章では、NHEJの鍵酵素DNAリガーゼ4をコードする*lig4*遺伝子の破壊によってGT効率の更なる改善を試みた。*ku80*破壊株では顕著なGT効率の改善が確認できない。遺伝子銃法を用いたことにより、ベクターが多コピー導入されていた。そこで、1コピーの破壊ベクター導入による遺伝子破壊とGT効率の改善を試みた。まず、本菌のもつ*lig4*遺伝子の塩基配列を決定した。続いて、染色体に1コピーの遺伝子導入が可能なアグロバクテリウム法を用いて*lig4*破壊ベクターを*M. alpina* 1S-4の胞子に導入し、二回交差相同組換えによる*lig4*破壊株を3.2%のGT効率で取得した。*lig4*破壊株を宿主としてGT効率を評価した結果、GT効率は67%に達し、野生株に比べGT効率の顕著な改善を確認した。

第五章では、効率的なGTシステムを用いたDGLA高生産株の分子育種を試みた。まず、5-fluoroorotic acidを含有する寒天培地上で選抜することで、*lig4*破壊株由来のウラシル要求性株を取得した。続いて、取得したウラシル要求性株の胞子に、アグロバクテリウム法にて $\Delta 5ds$ 破壊ベクターを導入した。結果、50%の高いGT効率で $\Delta 5ds$ 破壊株を取得した。破壊株の示すDGLA含有率は最大で40%に達した。さらに、低温培養条件下においてMaw3を活性化させることで、 $\omega 3$ 系PUFAの一種である $\omega 3$ -エイコサテトラエン酸（20:4 $\omega 3$, ETA）の生産を可能とした。これら破壊株は、化学変異剤による突然変異誘導によって取得した $\Delta 5ds$ 欠損変異株よりも高いDGLA、ETA含有率を示した。GT技術による分子育種が薬剤による育種とは異なり、PUFA生産性の低下ならびに生育の遅延を引き起こさないことを確認した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

不飽和脂肪酸は多彩な生理活性をもつため医薬品や健康食品に利用されており、その産業的需要に応じるため油糧微生物による生産が研究されている。本論文は、機能性脂肪酸の生産にむけて、生産微生物の探索、生合成酵素の機能解析、遺伝子ターゲティング (GT) システムの構築、ならびにこれらを応用した高度不飽和脂肪酸 (PUFA) の選択的高生産を試みたものである。本論文の評価すべき点は以下のとおりである。

1. 機能性脂肪酸であるエイコセン酸の高生産株 *Mortierella chlamydospora* CBS 529.75 を選抜し、最大 460 mg/L broth のエイコセン酸生産を達成した。
2. ω 3系 PUFA の生合成を担う ω 3 不飽和化酵素遺伝子を *M. alpina* 1S-4 から単離し、酵母発現系において酵素機能を解析した。結果、本酵素が C18、C20 脂肪酸に対する ω 3 位の不飽和化活性だけでなく、C16 脂肪酸に対する Δ 12/ Δ 15 不飽和化活性をもつことを明らかにした。
3. *M. alpina* 1S-4 の非相同末端結合 (NHEJ) に関与する Ku80 をコードする *ku80* 遺伝子を破壊した。*ku80* 破壊株を宿主とした Δ 5 不飽和化酵素 (Δ 5ds) 遺伝子破壊により、ジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA) の選択的高生産株の分子育種に成功した。
4. *M. alpina* 1S-4 の NHEJ の鍵酵素 DNA リガーゼ 4 をコードする *lig4* 遺伝子の破壊に成功し、*lig4* 破壊株における GT 効率は、野生株の 21 倍、67% に向上した。
5. *M. alpina* 1S-4 の *lig4* 破壊株を宿主とした GT システムを用いることにより、50% の高効率で Δ 5ds 破壊株を取得し、既存の変異育種株よりも高い DGLA 生産性を示す株の分子育種に成功した。また、この株を低温条件下で培養することにより、有効な生産法が確立されていなかったエイコサテトラエン酸の生産を実現した。

以上のように、本論文は、機能性脂肪酸の微生物生産を目指した生産微生物の探索、生合成酵素の機能解析、分子育種に有用な GT システムの構築、及び、これらの応用による機能性脂肪酸の選択的高生産に成功したものであり、発酵生理学、応用微生物学、応用生化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 27 年 2 月 5 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から 3 ヶ月以内)